

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>



# [12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/52

G01N 33/558

G01N 33/549

G01N 33/532

G01N 21/78

[21] 申请号 200510016288.2

[43] 公开日 2005 年 8 月 24 日

[11] 公开号 CN 1657938A

[22] 申请日 2005.3.11

[21] 申请号 200510016288.2

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院卫生  
学环境医学研究所

地址 300050 天津市和平区大理道 1 号

[72] 发明人 高志贤 方邢有 周焕英 王红勇  
房彦军 赵晓联

[74] 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事  
务所

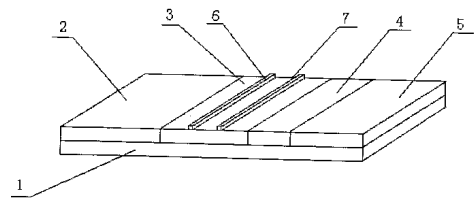
代理人 陆 艺

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称 检测罂粟碱的胶体金免疫试纸及其  
制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸及其制备方法，检测罂粟碱的胶体金免疫试纸包括基板，在所述基板上依次设置有吸水纸、硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜及加样纸，所述玻璃纤维膜浸泡于标记罂粟碱抗体的胶体金探针中，取出，干燥，所述硝酸纤维素膜上设置有罂粟碱与卵清蛋白的偶连物和羊抗兔抗体，本发明的试纸有操作简便快速、成本低、携带方便、非专业人员也能操作及可进行现场检测等优点。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸, 包括基板, 其特征在所述基板上依次设置有吸水纸、硝酸纤维膜、玻璃纤维膜及加样纸, 所述玻璃纤维膜浸泡于标记罂粟碱抗体的胶体金探针中, 取出, 干燥, 所述硝酸纤维膜上设置有罂粟碱与卵清蛋白的偶连物和羊抗兔抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸, 其特征是所述硝酸纤维膜上设置的罂粟碱与卵清蛋白的偶连物和羊抗兔抗体为点膜机喷成的两条线。

3. 根据权利要求1所述的一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸, 其特征是所述吸水纸的长度为 25-35mm, 所述硝酸纤维膜的长度为 20-30mm, 所述玻璃纤维膜的长度为 1-10mm, 所述加样纸的长度为 10-20mm。

4. 根据权利要求1所述的一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸, 其特征是所述基板的材料为聚氯乙烯。

5. 根据权利要求3所述的一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸, 其特征是所述吸水纸的长度为 30mm, 所述硝酸纤维膜的长度为 25mm, 玻璃纤维膜的长度为 6mm, 所述加样纸的长度为 15mm。

6. 一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸的制备方法, 包括如下步骤:

(1) 胶体金的制备; (2) 胶体金探针的标记: 将罂粟碱抗体用 0.005 mol/L NaCl 溶液透析过夜, 离心除去蛋白沉淀, 调至 0.1~0.5mg/mL; 取胶体金 100 mL, 调节胶体金溶液 pH 为 9.0, 搅拌下加入 2.4 mL 稀释的罂粟碱抗体, 继续搅拌 5-15 分钟, 加入小牛血清白蛋白, 使其质量百分比浓度为 1%, 再搅拌 5-15 分钟, 离心 20 分钟; 弃沉淀, 上清以 10000-15000 转/分钟, 离心 30-60 分钟; 弃上清, 沉淀用 0.01mol/L 含有质量百分比浓度为 1%小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液, 重新悬浮; 将沉淀用 0.01mol/L 含有质量百分比浓度为 1%小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液加质量百分比浓度为 0.02%叠氮钠 5-10 mL 悬浮, 4℃保存备用; (3) 罂粟碱与卵清蛋白的偶连物的合成: 取 0.15-0.5 mL 罂粟碱氨基衍生物加入 2.85 mL 无水乙醇, 再滴加 9mL 双蒸水, 最后加入 150~200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 盐酸碳二亚胺; 在上述溶液中加入 7 mg 卵清蛋白, 搅拌 30min; 加入 150~200 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐, 4℃搅拌反应 8-12 小时; 将上述反应液装入透析袋, 用 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液透析 2-4 天; (4) 制备检测罂粟碱的胶体金免疫试纸: 先将玻璃纤维膜放入含质量百分比浓度为 1%小牛血清白蛋白、质量百分比浓度为 1%吐温-20 的磷酸盐缓冲液中浸泡 30min, 37℃烘干, 再将玻璃纤维膜浸泡于标记罂粟碱抗体的胶体金探针中, 真空干燥; 在硝酸纤维膜上用点膜机将罂粟碱与卵清蛋白的偶连物和羊抗兔抗体喷成两条线, 分别为检测线和质控线, 经真空干燥后, 用含有质量百分比浓度为 1%小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液封闭 2h, 以 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤, 再真空干燥; 将吸水纸、硝酸纤维膜、玻璃纤维膜和加样纸, 依次粘于基板上, 裁成细条, 即制成一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸。

## 检测罂粟碱的胶体金免疫试纸及其制备方法

### 技术领域

本发明涉及一种罂粟碱检测试纸及其制备方法。

### 背景技术

近年来,许多不法商贩为了谋取暴利,在食品里面加入了罂粟壳的粉状物,罂粟壳(Fructus Depavevia)系罂粟科植物采完阿片后的干燥成熟果壳,内含罂粟碱(Papavarine)、吗啡、那可汀、可待因、那碎因等多种生物碱。尽管罂粟壳已不是真正意义上的毒品,但它也含有罂粟碱、可待因、吗啡等毒性成分,吃少量的罂粟壳粉也会让人上瘾,长期服用后,就相当于吸毒,易使人体产生依赖性,而造成瘾癖,对人体肝脏、心脏有毒害作用,危害极大。罂粟壳的粉末添加到汤料或火锅料等里面,没有特别味道,而且没有颜色,消费者自己无法判别。在食品中添加罂粟壳是国家严令禁止的违法行为。罂粟碱是罂粟壳中主要生物碱之一。对罂粟碱的检测一般采用色谱法,尽管色谱法能够精确定量,但由于其不仅需要贵重仪器,而且操作过程繁琐、时间长,操作人员必须具有一定的专业技术知识,才能操作,因此应用范围受限。

### 发明内容

本发明的目的是克服现有技术中的不足,提供一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸。

本发明的第二个目的是提供一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸的制备方法。

本发明的技术方案概述如下:

一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸,包括基板,在所述基板上依次设置有吸水纸、硝酸纤维膜、玻璃纤维膜及加样纸,所述玻璃纤维膜浸泡于标记罂粟碱抗体的胶体金探针中,取出,干燥,所述硝酸纤维膜上设置有罂粟碱与卵清蛋白的偶连物和羊抗兔抗体。

所述硝酸纤维膜上设置的罂粟碱与卵清蛋白的偶连物和羊抗兔抗体为点膜机喷成的两条线。

所述吸水纸的长度为25-35mm,最好为30mm,所述硝酸纤维膜的长度为20-30mm,最好为25mm,所述玻璃纤维膜的长度为1-10mm,最好为6mm,所述加样纸的长度为10-20mm,最好为15mm。

所述基板的材料最好为聚氯乙烯。

一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸的制备方法,包括如下步骤:

(1) 胶体金的制备;

(2) 胶体金探针的标记:将罂粟碱抗体用0.005 mol/L NaCl溶液透析过夜,离心除去蛋白沉淀,调至0.1~0.5mg/mL;取胶体金100 mL,调节胶体金溶液pH为9.0,搅

拌下加入 2.4 mL 稀释的罂粟碱抗体, 继续搅拌 5-15 分钟, 加入小牛血清白蛋白, 使其质量百分比浓度为 1%, 再搅拌 5-15 分钟, 离心 20 分钟; 弃沉淀, 上清以 10000-15000 转/分钟, 离心 30-60 分钟; 弃上清, 沉淀用 0.01mol/L 含有质量百分比浓度为 1% 小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液, 重新悬浮; 将沉淀用 0.01mol/L 含有质量百分比浓度为 1% 小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液加质量百分比浓度为 0.02% 叠氮钠 5-10 mL 悬浮, 4°C 保存备用;

(3) 罂粟碱与卵清蛋白的偶连物的合成 取 0.15-0.5 mL 罂粟碱氨基衍生物加入 2.85 mL 无水乙醇, 再滴加 9mL 双蒸水, 最后加入 150~200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳酸二亚胺; 在上述溶液中加入 7 mg 卵清蛋白, 搅拌 30min; 加入 150~200 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳酸二亚胺盐酸盐, 4°C 搅拌反应, 8-12 小时; 将上述反应液装入透析袋, 用 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液透析 2-4 天;

(4) 制备检测罂粟碱的胶体金免疫试纸 先将玻璃纤维膜放入含 1% 小牛血清白蛋白、1% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液中浸泡 30min, 37°C 烘干, 再将玻璃纤维膜浸泡于标记罂粟碱抗体的胶体金探针中, 真空干燥; 在硝酸纤维膜上用点膜机将罂粟碱与卵清蛋白的偶连物和羊抗兔抗体喷成两条线, 分别为检测线和质控线, 经真空干燥后, 用含有 1% 小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液封闭 2h, 以 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤, 再真空干燥; 将吸水纸、硝酸纤维膜、玻璃纤维膜和加样纸, 依次粘于基板上, 裁成细条, 即制成一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸。

胶体金免疫试纸有操作简便快速、成本低、携带方便、非专业人员也能操作及可进行现场检测等优点。

#### 附图说明

图 1 为本发明的结构示意图;

图 2 为本发明检测罂粟碱的胶体金免疫试纸的判读图。

#### 具体实施方式

下面结合附图和实施例对本发明作进一步的说明。

一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸, 包括基板 1, 在所述基板上依次设置有吸水纸 2、硝酸纤维膜 3、玻璃纤维膜 4 及加样纸 5, 玻璃纤维膜浸泡于标记罂粟碱抗体的胶体金探针中, 取出, 干燥, 所述硝酸纤维膜上设置有罂粟碱与卵清蛋白的偶连物 6 和羊抗兔抗体 7。

#### 实施例 1

罂粟碱检测胶体金免疫试纸制备方法, 它包括如下步骤:

1. 胶体金的制备 用三蒸水溶解氯金酸, 使其终浓度为 0.1g/L。先进行沸水浴, 待氯金酸溶液煮沸后, 每 100mL 加入 1% 柠檬酸三钠 2.5mL, 再沸水浴下快速搅拌, 直到氯金酸溶液的颜色稳定, 继续沸水浴 10min。

2. 胶体金探针的标记 将罂粟碱抗体用 0.005 mol/L NaCl 溶液透析过夜, 离心除去蛋白沉淀, 调至 0.5mg/mL, 取胶体金 100 mL, 用 0.2mol/L 的碳酸钾把胶体金溶液调至 pH

为 9.0, 磁力快速搅拌下缓慢加入 2.4 mL 稀释的罂粟碱抗体, 继续搅拌 10 min, 加入小牛血清白蛋白, 使其质量百分比浓度为 1%, 再搅拌 10 min, 将初步制得的胶体金探针以 4000rpm 离心 20 min; 弃沉淀, 上清以 10000rpm 离心 60 min; 弃上清, 沉淀用 0.01mol/L 含有质量百分比浓度为 1% 小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液, 重新悬浮; 同前离心洗涤二次, 将沉淀用 0.01mol/L 含有质量百分比浓度为 1% 小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液加 0.02% 叠氮钠 10 mL, 悬浮, 4°C 保存备用。

3. 罂粟碱与卵清蛋白的偶连物的合成: 小分子物质难以固定在硝酸纤维膜上, 只有使它连上大分子物质才能较好地固定。取 0.15 mL 罂粟碱氨基衍生物加入 2.85 mL 无水乙醇, 再滴加 9mL 双蒸水, 最后加入 150mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 盐酸碳二亚胺; 在上述溶液中加入 7 mg 卵清蛋白, 搅拌 30min; 加入 150 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 盐酸碳二亚胺, 4°C 搅拌反应 8 小时; 将上述反应液装入透析袋, 用 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲盐液透析 4 天。

4. 制备检测罂粟碱的胶体金免疫试纸: 将玻璃纤维膜裁成长 6mm 的细条, 然后放入含有质量百分比浓度为 1% 小牛血清白蛋白、质量百分比浓度为 1% 的吐温-20 的磷酸盐缓冲液中浸泡 30min, 37°C 烘干, 再将玻璃纤维膜浸泡于标记罂粟碱抗体的胶体金探针中, 真空干燥; 在硝酸纤维膜上用点膜机将罂粟碱与卵清蛋白的偶连物和羊抗兔抗体喷成两条线, 分别为检测线和质控线, 经真空干燥后, 用含有质量百分比浓度为 1% 小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲盐液封闭 2h, 以 0.01mol/L 磷酸盐缓冲盐液洗涤, 再真空干燥。将长为 30mm 吸水纸、25mm 硝酸纤维膜、6mm 玻璃纤维膜、15mm 加样纸, 依次粘于聚氯乙烯板上, 裁成细条, 即制成罂粟碱检测胶体金免疫试纸。

## 实施例 2

罂粟碱检测胶体金免疫试纸制备方法, 它包括如下步骤:

### 1. 胶体金的制备 (同实施例 1)

2. 胶体金探针的标记 将罂粟碱抗体用 0.005 mol/L NaCl 溶液透析过夜, 离心除去蛋白沉淀, 调至 0.1mg/ mL, 取胶体金 100 mL, 用 0.2mol/L 的碳酸钾把胶体金溶液调至 pH 为 9.0, 磁力快速搅拌下缓慢加入 2.4 mL 稀释的罂粟碱抗体, 继续搅拌 5 min, 加入小牛血清白蛋白, 使其质量百分比浓度为 1%, 再搅拌 5 min, 将初步制得的胶体金探针以 4000rpm 离心 20 min; 弃沉淀, 上清以 15000rpm 离心 30 min; 弃上清, 沉淀用 0.01mol/L 含有质量百分比浓度为 1% 小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液, 重新悬浮; 同前离心洗涤二次, 将沉淀用 0.01mol/L 含有质量百分比浓度为 1% 小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液加 0.02% 叠氮钠 5 mL, 悬浮, 4°C 保存备用。

3. 罂粟碱与卵清蛋白的偶连物的合成: 取 0.5 mL 罂粟碱氨基衍生物加入 2.85 mL 无水乙醇, 再滴加 9mL 双蒸水, 最后加入 150mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 盐酸碳二亚胺; 在上述溶液中加入 7 mg 卵清蛋白, 搅拌 30min; 加入 200 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 盐

酸碳二亚胺，4℃搅拌反应12小时；将上述反应液装入透析袋，用0.01mol/L的磷酸盐缓冲盐液透析2天。

4. 制备检测罂粟碱的胶体金免疫试纸：将玻璃纤维膜裁成长1mm的细条，然后放入含有质量百分比浓度为1%小牛血清白蛋白、质量百分比浓度为1%的吐温-20的磷酸盐缓冲液中浸泡30min，37℃烘干，再将玻璃纤维膜浸泡于标记罂粟碱抗体的胶体金探针中，真空干燥；在硝酸纤维膜上用点膜机将罂粟碱与卵清蛋白的偶连物和羊抗兔抗体喷成两条线，分别为检测线和质控线，经真空干燥后，用含有质量百分比浓度为1%小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲盐液封闭2h，以0.01mol/L磷酸盐缓冲盐液洗涤，再真空干燥。将长为25mm吸水纸、30mm硝酸纤维膜、1mm玻璃纤维膜、20mm加样纸，依次粘于聚氯乙烯板上，裁成细条，即制成罂粟碱检测胶体金免疫试纸。

### 实施例3

罂粟碱检测胶体金免疫试纸制备方法，它包括如下步骤：

1. 胶体金的制备（同实施例1）2. 胶体金探针的标记 将罂粟碱抗体用0.005mol/L NaCl溶液透析过夜，离心除去蛋白沉淀，调至0.3mg/mL，取胶体金100mL，用0.2mol/L的碳酸钾把胶体金溶液调至pH为9.0，磁力快速搅拌下缓慢加入2.4mL稀释的罂粟碱抗体，继续搅拌15min，加入小牛血清白蛋白，使其质量百分比浓度为1%，再搅拌15min，将初步制得的胶体金探针以4000rpm离心20min；弃沉淀，上清以13000rpm离心45min；弃上清，沉淀用0.01mol/L含有质量百分比浓度为1%小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液，重新悬浮；同前离心洗涤二次，将沉淀用0.01mol/L含有质量百分比浓度为1%小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液加0.02%叠氮钠7mL，悬浮，4℃保存备用。

3. 罂粟碱与卵清蛋白的偶连物的合成：取0.3mL罂粟碱氨基衍生物加入2.85mL无水乙醇，再滴加9mL双蒸水，最后加入200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)盐酸碳二亚胺；在上述溶液中加入7mg卵清蛋白，搅拌30min；加入180mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)盐酸碳二亚胺，4℃搅拌反应10小时；将上述反应液装入透析袋，用0.01mol/L的磷酸盐缓冲盐液透析3天。

4. 制备检测罂粟碱的胶体金免疫试纸：将玻璃纤维膜裁成长10mm的细条，然后放入含有质量百分比浓度为1%小牛血清白蛋白、质量百分比浓度为1%的吐温-20的磷酸盐缓冲液中浸泡30min，37℃烘干，再将玻璃纤维膜浸泡于标记罂粟碱抗体的胶体金探针中，真空干燥；在硝酸纤维膜上用点膜机将罂粟碱与卵清蛋白的偶连物和羊抗兔抗体喷成两条线，分别为检测线和质控线，经真空干燥后，用含有质量百分比浓度为1%小牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲盐液封闭2h，以0.01mol/L磷酸盐缓冲盐液洗涤，再真空干燥。将长为35mm吸水纸、20mm硝酸纤维膜、10mm玻璃纤维膜、10mm加样纸，依次粘于聚氯乙烯板上，裁成细条，即制成罂粟碱检测胶体金免疫试纸。

### 实施例4

罂粟碱检测胶体金免疫试纸的使用方法如下：

实际工作中有三种检样：一种是含油脂较多含蛋白质较少的清汤（如火锅汤等），用石油醚抽提除油脂后直接测定；一种是比较粘稠含油脂较多的肉汁（如牛腩汁等），这种检样通过三个步骤处理：首选取10 mL样品加2~3倍蒸馏水稀释，然后用石油醚抽提油脂2~3次，弃去醚层，最后加入一定浓度的硝酸铅除蛋白；另一种是含油脂和蛋白质都较少的清汤，可直接检测。检测：将加样纸一端插入待测液中，湿润后取出，水平放置，约3~5 min，观察结果见图2。如试纸条硝酸纤维膜上仅质控线出现一条紫红色带为阳性；如出现两条紫红色带为阴性；如质控线不出现紫红色带，无论检测线是否出现，测试结果均无效。

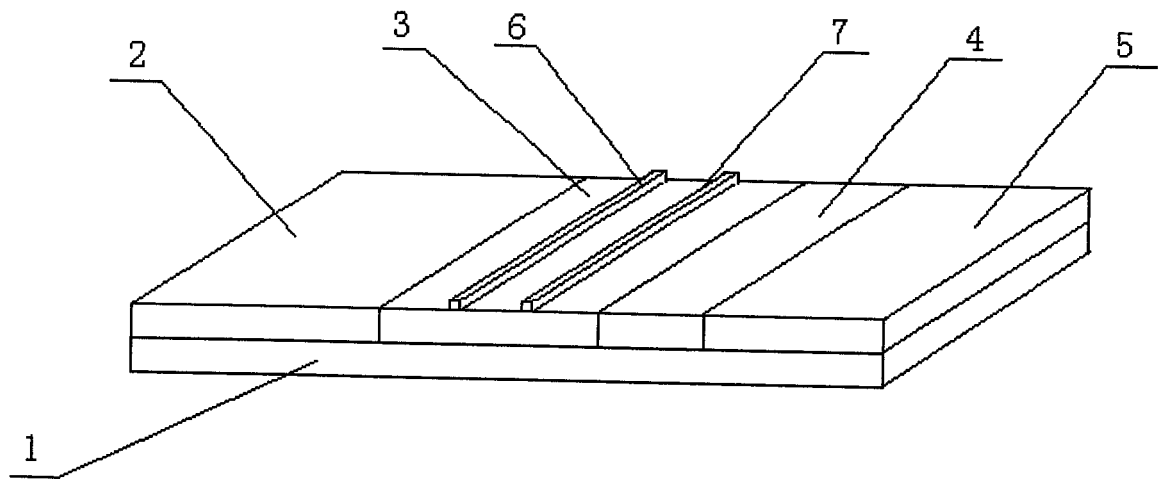


图 1

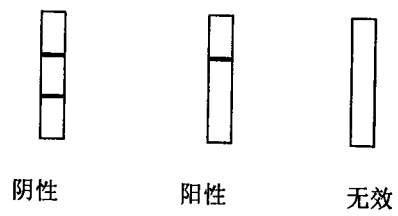


图 2

专利名称(译)	检测罂粟碱的胶体金免疫试纸及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1657938A</a>	公开(公告)日	2005-08-24
申请号	CN200510016288.2	申请日	2005-03-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
[标]发明人	高志贤 方邢有 周焕英 王红勇 房彦军 赵晓联		
发明人	高志贤 方邢有 周焕英 王红勇 房彦军 赵晓联		
IPC分类号	G01N21/78 G01N33/52 G01N33/532 G01N33/549 G01N33/558		
代理人(译)	陆艺		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测罂粟碱的胶体金免疫试纸及其制备方法，检测罂粟碱的胶体金免疫试纸包括基板，在所述基板上依次设置有吸水纸、硝酸纤维膜、玻璃纤维膜及加样纸，所述玻璃纤维膜浸泡于标记罂粟碱抗体的胶体金探针中，取出，干燥，所述硝酸纤维膜上设置有罂粟碱与卵清蛋白的偶连物和羊抗兔抗体，本发明的试纸有操作简便快速、成本低、携带方便、非专业人员也能操作及可进行现场检测等优点。

